

# PATENT COOPERATION TREATY

EO/US  
PCT/JP00/04413

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 11 January 2001 (11.01.01)	Applicant's or agent's file reference: PH-944-PCT
International application No.: PCT/JP00/04413	Priority date: 02 July 1999 (02.07.99)
International filing date: 03 July 2000 (03.07.00)	
Applicant: OGATA, Etsuro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
03 July 2000 (03.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

Form PCT/IB/331 (July 1992)

3750650



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 1 月 11 日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/02010 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 39/395 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04413
- (22) 国際出願日: 2000 年 7 月 3 日 (03.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/189322 1999 年 7 月 2 日 (02.07.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾形悦郎 (OGATA, Etsuro) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本一丁目30番23号 Tokyo (JP). 小沼悦郎 (ONUMA, Etsuro) [JP/JP]. 恒成利明 (TSUNENARI, Toshiaki) [JP/JP]. 齋藤英美 (SAITO, Hidemi) [JP/JP]. 東由美子 (AZUMA, Yumiko) [JP/JP]; 〒412-8543 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENTS FOR AMELIORATING LOW VASOPRESSIN LEVEL

(54) 発明の名称: 低バソプレシン濃度改善剤

(57) Abstract: Agents for ameliorating low vasopressin level which contain as the active ingredient a substance capable of inhibiting the binding of a parathyroid hormone-associated peptide to its receptor; and agents for ameliorating symptoms caused by a decrease in vasopressin level which contain as the active ingredient a substance capable of inhibiting the binding of a parathyroid hormone-associated peptide to its receptor.

(57) 要約:

本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む低バソプレシン濃度改善剤及び、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、バソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善剤である。

WO 01/02010 A1





## 明 細 書

## 低バソプレシン濃度改善剤

## 5 技術分野

本発明は副甲状腺ホルモン関連ペプチド（Parathyroid hormone related Peptide (PTHrP)）とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する低バソプレシン濃度改善剤に関する。

## 10 背景技術

生体の水分調節には体液中の各種電解質を至適濃度に維持する調節機構が存在する。電解質と水代謝を調節するホルモンとしては、アルドステロン（副腎皮質から分泌されるミネラルコルチコイド）やバソプレシン（脳下垂体後葉ホルモン）などが知られている。これらのホルモンの異常による各種疾患も知られている。

- 15 ホルモンの異常に起因する疾患としては、例えば、副腎皮質機能低下症（アジソン病）、アルドステロン産生過剰症、脳下垂体後葉機能低下症（尿崩症）、バソプレシン分泌異常症などが知られている。

一方、HHM（悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症）の臨床病態において、以下のような多彩な臨床症状が認められる（佐藤幹二著高カルシウム血症Q&A、医薬

- 20 ジャーナル社）。

全身症状：易疲労感、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、口渇、貧血

消化器症状：便秘、消化性潰瘍、急性膵炎

腎機能：多飲、多尿、口渇、尿路結石

神経筋症状：脱力感、筋力低下

- 25 精神神経症状：記銘力の障害、思考力の低下、意識混濁、昏睡

呼吸器症状：低酸素血症、多呼吸

上記症状の中で、特に多飲、多尿、口渇などは高カルシウム血症に特徴的な臨床症状である。

HHMの原因物質として副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP: Parathyroi

d hormone-related Peptide)が知られている。悪性腫瘍が産生するPTHrPによるHHMの発症メカニズムは、骨吸収促進及び腎からのカルシウム再吸収促進による。高カルシウム血症が一旦起こると、多尿や、食欲不振、悪心、嘔吐により脱水が生じ、血液の濃縮によりさらに高カルシウム血症が助長されることが知られている。

### 発明の開示

本発明は、PTHrPとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、低バソプレシン濃度に対する改善剤を提供することを目的とする。

- 10 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質により、低バソプレシン濃度及びバソプレシン濃度の低下に起因する症状が改善し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、低バソプレシン濃度改善剤である。上記物質としては、副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（例えばヒト型化又はキメラ化されたモノクローナル抗体）、該抗体の断片及び／又はその修飾物が挙げられる。ここで、ヒト型化抗体としては、ヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。さらに、低バソプレシン濃度は、癌に起因するものが挙げられる。
- 20 さらに、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、バソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善剤である。バソプレシン濃度の低下としては癌に起因するものが挙げられ、バソプレシン濃度の低下に起因する症状としては、多尿症、脱水症、口渴感及び高浸透圧血症からなる群から選択される少なくとも1種が挙げられる。さらに、本
- 25 発明の改善剤は、血液の高浸透圧及び脱水症を改善することから、嘔吐、下痢、発熱、発汗尿崩症、糖尿病などによって併発される高浸透圧血症の改善又は脱水症の改善にも有効である。

本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related Peptide : PTHrP) とその受容体 (PTHrP受容体) との結合を阻害する物質を有効成

分として含む低バソプレシン濃度改善剤である。低バソプレシン濃度とは、血中のバソプレシンの濃度が低下した状態又は症状を意味する。また、本発明は、PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、バソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善剤である。

- 5 本明細書中で「PTHrP受容体」とは、例えば特表平6-506598号公報に記載されているPTHrPと結合する受容体を指し、標的器官上（例えば骨や腎臓）に存在するPTHrP受容体か否かを問わない。

また、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」とは、PTHrPに結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質（例えば抗PTHrP抗体）、およびPTHrP受容体に結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質（例えばPTHrP受容体に対するアンタゴニスト（PTHrPアンタゴニストともいう））のいずれか一方又は両方を指す。具体的に、PTHrPアンタゴニストとしては、PTHrPペプチドの少なくとも一つのアミノ酸を置換、欠失したものやPTHrPペプチドの部分配列などが挙げられる。

- 15 抗PTHrP抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体（W096/33735号公報）又はキメラ抗体（特開平4-228089号公報）などの抗体のほか、ハイブリドーマ#23-57-137-1によって産生される抗体（#23-57-137-1抗体）などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であること好ましい。また、PTHrPアンタゴニストとしては、ポリペプチド又は低分子などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えばPTHrPに対して拮抗的にPTHrP受容体に結合する物質として、特開平7-165790号公報、特表平5-509098号公報又はPeptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 1031-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28 1992, 31 (16) 4026-4033に記載のPTHrPアンタゴニスト活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、上記例示のポリペプチドのうち、  
20 少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、付加、挿入されたポリペプチドであって、同等のPTHrPアンタゴニスト活性を有するものも本発明のPTHrPアンタゴニストに含まれる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第11-189322号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

本発明では、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」として抗PTHrP抗体を例に説明する。

## 1. 抗PTHrP抗体

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、低バソプレシン濃度の治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問うものではない。

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗PTHrP抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はPTHrPと結合することにより、PTHrPがPTH/PTHrP受容体に結合するのを阻害してPTHrPのシグナル伝達を遮断し、PTHrPの生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1により産生される#23-57-137-1抗体が挙げられる。

なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、以下のようにして作製できる。すなわち、PTHrPを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトPTHrPを、Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893に開示されたPTHrP遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、PTHrPをコードする遺伝子配列を公知の発現

ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のPTHrPタンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製PTHrPタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PTHrPのN末端の34個のペプチドについて、化学合成により作製することもでき、これを

5 感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

10 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に  
15 数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.6  
20 53) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature  
25 (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たと

例えば、ミルスティンらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000-6000程度) を通常30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、数日～数週間) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでPTHrPに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrPへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるPTHrPを投与

して抗PTHrP抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からPTHrPに対するヒト抗体を取得してもよい（国際公開番号W0 94/25585 号公報、W0 93/12227 号公報、W0 92/03918 号公報、W0 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、  
5 通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

### 3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

具体的には、抗PTHrP抗体を産生するハイブリドーマから、抗PTHrP抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 52  
20 94-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製)等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)等を使用すること

ができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。

目的とする抗PTHrP抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗PTHrP抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（WO 94/11523 号公報参照）。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質（ヤギ $\beta$ カゼインなど）をコードする遺伝子に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

#### 4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、以下の方法を用い



て製造することができる。

本発明に有用なキメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

- 5 ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。
- 10 具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により増幅する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体を得ることができる (EP 239400号公報、
- 15 WO 96/02576 号公報参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

20

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4を、L鎖ではC $\kappa$ 、C $\lambda$ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

25

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の改善剤の有

効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23-57-137-1抗体は、マウス由来の#23-57-137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK, Deftos Mら, Scand.

5 J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1、FR2およびFR3) 並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier AMら, Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

10 なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月15日付で、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) につ

15 いてはFERM BP-5630として、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、PTHrPに結合し、PTHrPの活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F

20 (ab')<sub>2</sub>、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Bett

25 er, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参

照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 5 (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

15 また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により20 生産させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗PTHrP抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

## 6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗

体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

5     また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

10     SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配  
15     列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041  
20     -1043) により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 437  
9) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

25     複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものをを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、

ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

#### 7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

#### 8. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用される抗PTHrP抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場

合、PTHrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗PTHrP抗体を含む試料、例えば、抗PTHrP抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定すること

5      とで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用する抗体の活性を確認するには、抗PTHrP抗体の中和活性を測定する。

#### 9. 投与方法および製剤

本発明の改善剤は、バソプレシン濃度が低下した状態又は症状（低バソプレシン濃度）に対する治療又は改善を目的として使用される。また、低バソプレシン濃度となった原因は癌によるものであるか否かを問わない。例えば、癌に起因するものとして、悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症が挙げられる。

さらに、本発明の改善剤は、バソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善を目的として投与することができる。バソプレシンの濃度が低下する原因は特に限定されるものではないが、本発明においては癌に起因するものが好ましい。また、バソプレシン濃度の低下に起因する症状としては、例えば多尿症、脱水症及び口渇感が挙げられるがこれらに限定されるものではない。本発明の改善剤は、上記症状のいずれか1種に対して、あるいは複数種が合併した症状に対して投与することができる。

20      本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する改善剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には経肺剤型（例えばネフライザーなどの器具を用いた経肺投与剤）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の例として、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mg から1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01~100000mg/body、好ましくは0.1~10000mg/body、さらに好ましくは0.5~1000mg/body、さらに好ましくは1~100mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明

の抗PTHrP抗体を含有する改善剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、低バソプレシン濃度が生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよい。

本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する改善剤は、常法にしたがって

- 5 製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

- このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビ  
10 ニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、  
15 ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

- 実際の添加物は、本発明改善剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせ選ばれるが、これらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗PTHrP抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、  
20 ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

25

#### 図面の簡単な説明

図1は、高カルシウム血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の血中バソプレシン濃度に対する薬効試験結果を示す図である。

図2は、高カルシウム血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の尿量

に対する薬効試験結果を示す図である。

図3は、高カルシウム血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の血中バソプレシン濃度に対する薬効試験結果を示す図である。

図4は高カルシウム血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の血清浸透圧に対する薬効試験結果を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例等にその技術的範囲を限定するものではない。

#### 10 〔実施例1〕 高カルシウム血症モデル動物での薬効試験（1）

##### （1）目的

ヒト腫瘍－ヌードラット移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の血中バソプレシン濃度、及び尿量に対する効果を検討した。

#### 15 （2）方法

モデル動物としてヒト肺大細胞癌LC-6（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺大細胞癌LC-6を移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少などの症状を発症する。本実施例においては、この高カルシウム血症モデル動物において血中バソプレシン濃度の測定を行い、正常ラットの測定値と比較し、さらにヒト型化モノクローナル抗体が血中バソプレシン濃度に与える影響を評価した。また、尿量の測定と尿量に与えるヒト型化モノクローナル抗体の影響についても評価した。

高カルシウム血症モデル動物の作製及び群分けは、以下のように行った。すなわち、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoにて継代しているヒト肺大細胞癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。ラットとして5週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラットを購入し（日本クレア）、1週間の馴化の後6週齢のラットに腫瘍を移植した。腫瘍塊を移植してから1ヶ月半程度後に、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物とし



て薬効評価に用いた。ラットは、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

5 バソプレシン濃度測定試験においては、上記の方法で作製及び群分けした高カルシウム血症モデル動物に、3 mg/kgの用量で、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体を週1回の間隔で（0日、7日、14日、21日、28日及び35日目）尾静脈内に投与した。一方、既に高カルシウム血症治療薬として使用されているアレンドロネートは、2.5mg/kgの用量で週2回の間隔で（0日、3日、7日、10日、14日、17日、21日、24日、28日、31日、35日及び38日目）尾静脈内に投与した。対照には、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を0日、7日、14日、21日、28日及び35日目に尾静脈内に投与した。試験期間中、移植腫瘍塊の明らかな脱落例は結果の集計から除外した。

血中バソプレシン濃度の測定には、上記薬物（抗体、アレンドロネート、PBS）投与開始後42日目に下行大動脈から採血し、EDTAにて分離した血漿を用いた。採血時に移植腫瘍が明らかに脱落していた個体のデータは集計から除外したため、採血時の各群の数は、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体投与群で12匹、アレンドロネート投与群で3匹、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）投与群で8匹、正常ラット群で5匹であった。なお、血中バソプレシン濃度の測定は、血漿を用いたRIA法により行った。

尿量測定の試験においては、上記方法により作製及び群分けした高カルシウム血症モデル動物に、3mg/kgのPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体、又は5mg/kgのアレンドロネートを尾静脈内に投与した。対照群にはリン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に投与した。投与後13日目の朝から14日目の朝にかけての24時間の尿を集め、重量と比重を測定し、尿体積を算出した。

### (3)結果

25 高カルシウム血症モデル動物において、血中バソプレシン濃度が低下していることが明らかになった。このモデル動物に対し、ヒト型化モノクローナル抗体は、高カルシウム血症モデル動物における低下した血中バソプレシン濃度を改善した（図1）。さらに、ヒト型化モノクローナル抗体は、高カルシウム血症モデル動物における多尿の症状を改善する効果が認められた（図2）。

## 〔実施例 2〕 高カルシウム血症モデル動物での薬効試験（2）

## （1）目的

ヒト腫瘍-ヌードラット移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の血中バソプレシン濃度、及び血清浸透

5 圧に対する効果を検討した。

## （2）方法

モデル動物としてヒト肺大細胞癌LC-6（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺大細胞癌LC-6を移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少などの症状を発生する。本実施例においては、この高カルシウム血症モデル動物において血中バソプレシン濃度の測定を行い、正常ラットの測定値と比較し、さらにヒト型化モノクローナル抗体が血中バソプレシン濃度に与える影響を評価した。また、血清浸透圧の測定と血清浸透圧に与えるヒト型化モノクローナル抗体の影響についても評価した。

15 高カルシウム血症モデル動物の作製及び群分けは、以下のように行った。  
すなわち、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoにて継代しているヒト肺大細胞癌LC-6を摘出し、3 mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。ラットとして4週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラットを購入し（日本クレア）、10日間の馴化の後6週齢の  
20 ラットに腫瘍を移植した。腫瘍塊を移植してから1ヶ月半程度後に、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物として薬効評価に用いた。ラットは、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

上記の方法で作製及び群分けした高カルシウム血症モデル動物に、0.11、0.33、  
25 1、3 mg/kgの用量で、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体を週1回の間隔で（0日、7日、14日、21日、28日及び35日目）尾静脈内に投与した。対照には、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を0日、7日、14日、21日、28日及び35日目に尾静脈内に投与した。試験期間中、移植腫瘍塊の明らかな脱落例は結果

の集計から除外した。各群の数は、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体投与群の0.11、0.33、1、3 mg/kgの各容量投与群でそれぞれ7匹、8匹、8匹、6匹、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）投与群で8匹、正常ラット群で7匹であった。

- 5 上記抗体投与後42日目に下行大動脈から採血し、EDTA入りチューブで血漿を、セパラピットチューブで血清をそれぞれ分離した。血中バソプレシン濃度の測定は、血漿を用いたRIA法により行った。血中浸透圧の測定は血清を用いた氷点降下法により行った。

### (3) 結果

- 10 高カルシウム血症モデル動物において、血中バソプレシン濃度が低下していることが明らかになった。このモデル動物に対し、ヒト型化モノクローナル抗体は、高カルシウム血症モデル動物における低下した血中バソプレシン濃度を用量依存的に改善した（図3）。さらに、ヒト型化モノクローナル抗体は、高カルシウム血症モデル動物における増加した血中浸透圧を用量依存的に改善する効果が認め  
15 られた（図4）。

#### 〔参考例1〕

抗PTHrP(1-34)マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

- ヒトPTHrP(1-34)に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#23-57-154および#23-57-137-1は、以下の通り作製した（Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993）。なお、ヒトPTHrP(1-34)のアミノ酸配列を配列番号75に示す。

- 免疫原として使用するために、PTHrP(1-34)（Peninsula 製）とキャリアタンパクであるサイログロブリンをカルボジイミド（Dojinn）を用いて結合した。サイログロブリンと結合したPTHrP(1-34)を透析し、タンパク濃度として2 mg/ml  
25 となるように調製した後、フロイントアジュバント（Difco）と1:1で混合し、エマルジョン作製後、16匹の雌性BALB/Cマウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり100  $\mu$ gを11回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、

マウス尾静脈より採血し、血清分離後 R I A バッファーで希釈した抗血清と 125I 標識 PTHrP(1-34) を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していない PTHrP(1-34) を動物あたり 50  $\mu$  g を最終免疫した。

- 5 最終免疫 3 日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株 P3x63Ag8U.1 を 50% ポリエチレングリコール 4000 を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を  $2 \times 10^4$  / ウェルの細胞数で 85 枚の 96 穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別は HAT 培地を用いて行った。

- 10 ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT 培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化 RIA 法にて PTHrP 認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15% FCS を含む RPMI-1640 培地に 0PI-supplement (Sigma) を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP(1-34) との結合能の強いクローン #23-57-154 および #23-57-137-1 を得た。

- 15 なお、ハイブリドーマクローン #23-57-137-1 は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1 として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、平成 8 年 8 月 15 日に、FERM BP-5631 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

- 20 [参考例 2] ヒト PTHrP(1-34) に対するマウスモノクローナル抗体の V 領域をコードする DNA のクローニング

ヒト PTHrP(1-34) に対するマウスモノクローナル抗体 #23-57-137-1 の可変領域をコードする DNA を次の様にしてクローニングした。

(1) mRNA の調製

- 25 ハイブリドーマ #23-57-137-1 からの mRNA を Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech 社) を用いて調製した。ハイブリドーマ #23-57-137-1 の細胞を抽出バッファーで完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、oligo (dT)-Cellulose Spun Column にて mRNA を精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA 沈殿物を溶出バッファーに溶解した。

(2) マウス H 鎖 V 領域をコードする遺伝子の cDNA の作製および増幅

## (i) #23-57-137-1抗体H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には5'-Ampli FINDER RACE kit (CLONETECH社) を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA合成に使用するプライマーは、マウスH鎖定常領域 (C領域) とハイブリダイズするMHC2プライマー (配列番号1) を用いた。前記のようにして調製したmRNA約 2  $\mu$ g を鋳型としてMHC2プライマー10pmole を加え、逆転写酵素と52°C、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

6 N NaOH でRNAを加水分解 (65°C、30分間) した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。T4DNAリガーゼで37°Cで6時間、室温で16時間反応することにより、合成したcDNAの5'末端にAmpli FINDER Anchor (配列番号42) を連結した。これを鋳型としてPCRにより増幅するためのプライマーとしてAnchorプライマー (配列番号2) およびMHC-G1プライマー (配列番号3) (S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。

PCR溶液は、その50  $\mu$ l 中に10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットのTaKaRa Taq (宝酒造)、10pmole のAnchorプライマー、並びにMHC-G1プライマー及びAmpli FINDER Anchor を連結したcDNAの反応混合物1  $\mu$ l を含有する。この溶液に50  $\mu$ l の鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) を用い、94°Cにて45秒間、60°Cにて45秒間、72°Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。

## (ii) #23-57-137-1 抗体L鎖V領域のcDNAのクローニング

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には5'-Ampli Finder RACE Kit (Clonetech) を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA合成に使用するプライマーは、oligo-dTプライマーを用いた。前記のように調製したmRNA約 2  $\mu$ g を

鋳型としてoligo-dTプライマーを加え、逆転写酵素と52℃、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。6 N NaOHでRNAを加水分解（65℃、30分間）した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。合成したcDNAの5'末端に前記Ampli FINDER Anchor をT4DNAリガーゼで37℃で6時間、室温で16時間反応させる

5 ことにより連結した。

マウスL鎖入鎖定常領域の保存配列からPCRプライマーMLC（配列番号4）を設計し、394 DNA/RNA Synthesizer（ABI社）を用いて合成した。PCR溶液は、その100  $\mu$  l 中に10 mM Tris-HCl（pH8.3）、50mM KCl、0.25mM dNTPs（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 ユニットの AmpliTaq（PERKIN ELMER）、  
10 50pmole のAnchorプライマー（配列番号2）、並びにMLC（配列番号4）およびAmpli FINDER Anchorを連結したcDNAの反応混合物1  $\mu$  l を含有する。この溶液に50  $\mu$  l の鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model480J（Perkin Elmer）を用い、94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで35回行った。

### 15 (3) PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を、3 %Nu Sieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H鎖V領域として約550bp 長、L鎖V領域として約550bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit(BI0101)を用い、キット添付の処  
20 方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl（pH7.4）、1 mM EDTA 溶液20  $\mu$  l に溶解した。得られたDNA溶液1  $\mu$  l を制限酵素XmaI（New England Biolabs）により37℃で1時間消化し、次いで制限酵素EcoRI（宝酒造）により37℃で1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

25 こうして、5'-末端にEcoRI 認識配列を有し、3'-末端にXmaI認識配列を有するマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-XmaI DNA断片とEcoRI 及びXmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターをDNAライゲーションキットver.2（宝酒造）を用い、添付の処

方に従い16℃で1時間反応させ連結した。次に10  $\mu$  l の上記連結混合物を大腸菌 JM109コンピテント細胞（ニッポンジーン）100  $\mu$  l に加え、この細胞を氷上で15分間、42℃にて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで300  $\mu$  l のSOC 培地（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）を加え37℃にて30分間インキュベートした後、100  $\mu$  g/ml又は50  $\mu$  g/mlのアンピシリン、0.1mM のIPTG、20  $\mu$  g/mlのX-galを含むLB寒天培地または2xYT寒天培地（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を100  $\mu$  g/ml又は50  $\mu$  g/mlのアンピシリンを含有するLB培地または2xYT培地2 mlで37℃にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機PI-100  $\Sigma$ （クラボウ）又はQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

#### 15 (4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (ABI社Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4（宝酒造）（配列番号5）及びM13 Primer RV（宝酒造）（配列番号6）を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1H04、L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1L24と命名した。プラスミドMBC1H04 およびMBC1L24 に含まれるマウス#23-57-137-1抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列（対応するアミノ酸配列を含む）をそれぞれ配列番号57、65に示す。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域の断片については配列番号46、L鎖V領域の断片については配列番号45に示す。

なお、前記プラスミドMBC1H04 およびMBC1L24 を有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (MBC1H04) およびEscherichia coli JM109 (MBC1L24) として、

工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04)についてはFERM BP-5628として、*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)についてはFERM BP-5627としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

5 (5) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定

H鎖V領域およびL鎖V領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat,

10 E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dep t. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabat らにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示すごとく

15 決定した。

なお、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号59～61に示し、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号62～64に示した。

表 1

V領域	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
H鎖V領域	5 7	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	6 5	23-34	50-60	93-105

20

〔参考例3〕キメラ抗体の構築

(1) キメラ抗体H鎖の構築

(i) H鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、

25 クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマー



MBC1-S1（配列番号7）はV領域のリーダー配列の5'-側をコードするDNAにハイブリダイズし、且つKozak コンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。前方プライマーMBC1-a（配列番号8）はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライスドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq（宝酒造）を用い、50 $\mu$ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.07 $\mu$ gのプラスミドMBC1H04、プライマーとしてMBC1-aおよびMBC1-S1をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTP含む条件で添付緩衝液を使用して50 $\mu$ lの鉱油を上層し、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

437bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA溶液20 $\mu$ lに溶解した。得られたDNA溶液1 $\mu$ lを制限酵素BamHI、Hind III（宝酒造）により37 $^{\circ}$ C 1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むHind III-BamHI DNA断片をHind IIIおよびBamHIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマーM13 Primer M4 およびM13 Primer RVをプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にHind III認識配列及びKozak 配列、3'-側にBamHI認識配列を持つプラスミドをMBC1H/pUC19と命名した。

(ii) cDNAタイプのマウス-ヒトキメラH鎖の作製のためのH鎖V領域の構築  
ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築した

マウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。H鎖V領域のための後方プライマーMBC1HVS2（配列番号9）はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番のアスパラギンをグリシンに変換し、且つKozak コンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol.,196, 947-950, 1987)並びにHind IIIおよびEcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2（配列番号10）はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5'-側の配列をコードしApa I およびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq（宝酒造）を用い、50 $\mu$ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6  $\mu$ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taqを2.5U、0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50 $\mu$ lの鉱油を上層して94 $^{\circ}$ C 1分間、55 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem GTG アガロース（FMC Bio.Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。456bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 $\mu$ lに溶解した。

得られたDNA溶液1 $\mu$ lを制限酵素EcoRI およびSmaI（宝酒造）により37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'-側にEcoRI およびHind III認識配列並びにKozak 配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドを

MBC1Hv/pUC19と命名した。

(iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f (WO92/19759参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 $\kappa$ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a (WO92/19759参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 $\alpha$ プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-BamHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI部位が欠失したDHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1-fをHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C $\gamma$ 1をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRI およびHind

III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

プラスミドMBC1HcDNA/pUC19 をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして  
5 得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh-g $\gamma$ 1 (WO92/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHIアダプター (宝酒造) を連結することにより構築した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラス  
10 ミドMBC1HcDNA/pUC19 をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体H鎖配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCHO1 と命名した。なお、発現ベクターpCHO1  
15 化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

## (2) ヒトL鎖定常領域の構築

### (i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含むpUC19 ベクターを構築するために、Hind III部位欠  
20 失pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター2  $\mu$ gを20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100 mM KCl、8 Uの Hind III (宝酒造) を含有する反応混合液20  $\mu$ l 中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿により回収した。

25 回収したDNAを50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6 UのKlenowフラグメント (GIBCO BRL)を含有する50  $\mu$ l の反応混合液中で室温にて20分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクターDNAをエタノール沈殿により回収した。

回収したベクターDNAを50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、1 mM DTT、5 % (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 UのT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL)を含有する反応混合液10  $\mu$  l 中で16°Cで2時間反応させ、自己連結させた。反応混合液5  $\mu$  l を大腸菌JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100  $\mu$  l に加え、氷上で30分間静置した後、42°Cにて1分間、さらに氷上で1分間静置した。SOC培地500  $\mu$  l を加えて、37°Cで1時間インキュベーションした後、X-gal とIPTGを表面に塗布した2×YT寒天培地 (50  $\mu$  g/mlアンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にまき、37°Cで一夜培養して形質転換体を得た。

形質転換体を、50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地20mlで37°C一夜培養し、菌体画分からPlasmid Mini Kit(QIAGEN)を用いて、添付の処方に従ってプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドをHind IIIで消化し、Hind III部位が欠失していることを確認したプラスミドをpUC19  $\Delta$ Hind IIIと命名した。

(ii)ヒトL鎖 $\lambda$ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

ヒト抗体L鎖 $\lambda$ 鎖C領域は、Mcg+ Ke+ Oz-、Mcg- Ke- Oz-、Mcg- Ke- Oz+、Mcg- Ke+ Oz-の少なくとも4種類のアイソタイプが知られている (P.Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)。#23-57-137-1マウスL鎖 $\lambda$ 鎖C領域と相同性を有するヒト抗体L鎖 $\lambda$ 鎖C領域をEMBLデータベースで検索した結果、アイソタイプがMcg+ Ke+ Oz- (accession No. X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)のヒト抗体L鎖 $\lambda$ 鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1マウスL鎖 $\lambda$ 鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

そこで、このヒト抗体L鎖 $\lambda$ 鎖C領域をコードする遺伝子の構築をPCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI 社)を用いて行った。HLAMB1 (配列番号11) およびHLAMB3 (配列番号13) はセンスDNA配列を有し、HLAMB2 (配列番号12) およびHLAMB4 (配列番号14) はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23b

pの相補的配列を有する。

外部プライマーHLAMBS（配列番号15）、HLAMBR（配列番号16）はHLA MB1、HLAMB4とそれぞれ相同な配列を有しており、またHLAMBSはEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、HLAMBRはEcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一PCRでHLAMB1-HLAMB2 とHLAMB3-HLAMB4 の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

PCRはTaKaRa Ex Taq（宝酒造）を使い、添付の処方に従って行った。第一PCRでは、5 pmole のHLAMB1および 0.5pmole のHLAMB2と5 UのTaKaRa Ex Taq（宝酒造）とを含有する100  $\mu$  l の反応混合液、あるいは0.5pmoleのHLAMB3および5 pmole のHLAMB4と5 UのTaKaRa Ex Taq（宝酒造）とを含有する100  $\mu$  l の反応混合液を用い、50  $\mu$  l の鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。第二PCR は、反応液を50  $\mu$  l ずつ混合し、50  $\mu$  l の鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。第三PCRは、反応液に外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを各50pmole ずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物のDNA断片を3%低融点アガロースゲル（NuSieve GTG Agarose, FMC）で電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用い、添付の処方に従ってゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片を50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100mM NaCl、8 UのEcoRI（宝酒造）を含有する20  $\mu$  l の反応混合液中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液8  $\mu$  l に溶解した。

プラスミドpUC19  $\Delta$ Hind III 0.8  $\mu$  gを同様にEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラス

ミドpUC19  $\Delta$ Hind IIIを50 mM Tris-HCl (pH9.0)、1 mM  $MgCl_2$ 、アルカリホスファターゼ(E.coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液50  $\mu$  l 中で37°C、30分間反応させ脱リン酸処理 (BAP処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿により回収した後、10mM Tris-H

5 Cl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l に溶解した。

上記のBAP処理したプラスミドpUC19  $\Delta$ Hind III 1  $\mu$  l と先のPCR産物 4  $\mu$  l をDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地 2 mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

10

上記プラスミドについて、クローニングされたDNAの塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には373A DNA sequencer (ABI 社) を用い、プライマーにはM13 Primer M4 およびM13 Primer RV (宝酒造) を用いた。その結果、クローニングされたDNAの内部に12bpの欠失があることが判明した。このDNA

15

を含むプラスミドをC  $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマーHCLMS (配列番号17)、HCLMR (配列番号18) を新たに合成し、PCRで再度正しいDNAの構築を行った。

第一PCRで欠失DNAを含むプラスミドC  $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 を鋳型とし、プライマーHLAMBSとHCLMR、HCLMS とHLAMB4で反応を行った。PCR産物を

20

それぞれ精製し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMB4を添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

第一PCRでは、鋳型としてC  $\lambda$   $\Delta$ /pUC19 0.1  $\mu$  g、プライマーHLAMBSおよびHCLMR 各50pmole、あるいはHCLMS およびHLAMB4各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100  $\mu$  l の反応混合液を用い、50

25

$\mu$  l の鉱油を上層して94°Cにて1分間、60°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。

PCR産物HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp) をそれぞれ3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製した。第二PCRでは精製DNA断片各40ng、1 U

のTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する20  $\mu$  l の反応混合液を用い、25  $\mu$  l の鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行った。

第三PCRでは、第二PCR反応液2  $\mu$  l、外部プライマーHLAMBS、HLAMB4  
5 各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100  $\mu$  l の反応混合液を用い、50  $\mu$  l の鉱油を上層した。PCRは、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物である357bp のDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製した。

10 得られたDNA断片0.1  $\mu$  gをEcoRI で消化した後、BAP処理したプラスミド pUC19 $\Delta$ Hind IIIにサブクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2 mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

15 精製したプラスミドについて塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNasequencer (ABI 社) にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC $\lambda$ /pUC19 とした。

(iii) ヒトL鎖 $\kappa$ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

20 プラスミドHEF-PM1k-gk (WO92/19759) からL鎖 $\kappa$ 鎖C領域をコードするDNA断片をPCR法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA synthesizer (ABI 社) を用いて合成した前方プライマーHKAPS (配列番号19) はEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、後方プライマーHKAPA (配列番号20) はEcoRI認識配列を有するように設計した。

25 鋳型となるプラスミドHEF-PM1k-gk 0.1  $\mu$  g、プライマーHKAPS、HKAPA 各50pmole、5 UのTaKaRaEx Taq (宝酒造) を含有する100  $\mu$  l の反応混合液を用い、50  $\mu$  l の鉱油を上層した。94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の反応を30サイクル行った。360bp のPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲル



から回収、精製した。

得られたDNA断片をEcoRI で消化した後、B A P 処理したプラスミドpUC19  $\Delta$ Hind IIIにクローニングした。大腸菌 J M 1 0 9 コンピテント細胞に形質転換し、50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する 2  $\times$  Y T 培地 2 mlで一夜培養し、菌体

5 画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドの塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造)を用い、373A DNA sequencer(ABI社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC  $\kappa$ /pUC19 とした。

### (3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築

10 キメラ#23-57-137-1抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミドC  $\lambda$ /pUC19、C  $\kappa$ /pUC19 のヒト抗体定常領域の直前にあるHind III、BlnI部位に、#23-57-137-1L鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1抗体L鎖V領域およびL鎖 $\lambda$ 鎖またはL鎖 $\kappa$ 鎖定常領域をコードするpUC19 ベクターを作製した。EcoRI 消化によってキメラ抗体L

15 鎖遺伝子を切り出し、H E F 発現ベクターへサブクローニングを行った。

すなわち、プラスミドMBC1L24 から#23-57-137-1抗体L鎖V領域をPCR法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI 社)を用いて行った。後方プライマーMBCCHL1 (配列番号21)はHind III認識配列とKozak 配列(Kozak,M.et al.,J.Mol.Biol.196,947-950,1987)

20 を、前方プライマーMBCCHL3 (配列番号22)はBglIII、EcoRI 認識配列を有するように設計した。

PCRは、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM d N T P、0.1  $\mu$ gのMBC1L24、プライマーとしてMBCCHL1 およびMBCCHL3 を各50pmole、1  $\mu$ lの AmpliTaq(PERKIN ELMER)を含有する100

25  $\mu$ lの反応混合液を用い、50  $\mu$ lの鉱油を上層して94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。

444bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN II kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20  $\mu$ lに溶解した。PCR産物1  $\mu$ lをそれぞれ10mM Tr

is-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、50mM NaCl、8 UのHind  
III (宝酒造) および8 UのEcoRI (宝酒造) を含有する反応混合液20  $\mu$  l 中で  
37°Cにて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、  
DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA  
5 溶液8  $\mu$  l に溶解した。

プラスミドpUC19 1  $\mu$  gを同様にHind IIIおよびEcoRI で消化し、フェノール  
およびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ  
(E.coli C75, 宝酒造) でBAP処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、  
DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l  
10 H7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l に溶解した。

BAP処理したプラスミドpUC19 1  $\mu$  l と先のPCR産物4  $\mu$  l をDNA Ligation Kit Ver.2  
(宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)に前述と同様に  
形質転換した。これを50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2×YT寒天培地にまき、37°Cで一夜培養した。  
得られた形質転換体を、50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2 mlで37°Cで一夜培養した。  
菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。  
塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドをCHL/pUC19 とした。

プラスミドC $\lambda$ /pUC19、C $\kappa$ /pUC19 各1  $\mu$  gをそれぞれ20mM Tris-HCl(pH8.5)、  
10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100mM KCl、8 Uの Hind III (宝酒造) および2 UのBlnI (宝酒造) を含有する  
反応混合液20  $\mu$  l 中で37°Cにて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、  
DNAをエタノール沈殿で回収した後、37°Cで30分間BAP処理を行った。反応液をフェノール  
およびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、  
1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l に溶解した。

#23-57-137-1 L鎖V領域を含むプラスミドCHL/pUC19 から8  $\mu$  gを同様に  
Hind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bp のDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した  
後、GENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l  
25 に溶解した。

このL鎖V領域DNA 4  $\mu$  l をBAP処理したプラスミドC $\lambda$ /pUC19 またはC $\kappa$ /pUC19 各1  $\mu$  l にサブクローニングし、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地3 mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19、MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 とした。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19 およびMBC1L( $\kappa$ )/pUC19 をそれぞれEcoRIで消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bpのDNA断片をGENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l に溶解した。

発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7  $\mu$  gをEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した。回収したDNA断片をBAP処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bpのDNA断片をGENECLEANII Kit(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10  $\mu$  l に溶解した。

BAP処理したHEFベクター2  $\mu$  lを上記プラスミドMBC1L( $\lambda$ ) またはMBC1L( $\kappa$ ) EcoRI断片各3  $\mu$  lと連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$  g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2 mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、100mM KCl、8 UのHindIII (宝酒造) および2 UのPvuI (宝酒造) を含有する反応混合液20  $\mu$  l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれMBC1L( $\lambda$ )/neo、MBC1L( $\kappa$ )/neo とした。

#### (4) COS-7細胞のトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミドMBC1HcDNA/pCOS1とMB

C1L( $\lambda$ )/neoまたはMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L( $\kappa$ )/neoの組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に $1 \times 10^7$  細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA  $10 \mu\text{g}$ を加え、1,500V,  $25 \mu\text{F}$ の静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDME M培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

- 10 また、COS-7細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSIIキット(BioRad)を用いてキット添付の処方に従って行った。

#### (5) ELISA

##### (i) 抗体濃度の測定

- 抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー( $0.1\text{M NaHCO}_3$ 、 $0.02\% \text{NaN}_3$ )で $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)  $100 \mu\text{l}$ で固相化し、 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファー( $50\text{mM Tris-HCl}$ 、 $1\text{mM MgCl}_2$ 、 $0.1\text{M NaCl}$ 、 $0.05\% \text{Tween}20$ 、 $0.02\% \text{NaN}_3$ 、 $1\% \text{牛血清アルブミン(BSA)}$ 、 $\text{pH}7.2$ )でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)  $100 \mu\text{l}$ を加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、 $1\text{mg/ml}$ の基質溶液(Sigma104、 $p$ -ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定
- 25 測定のスタンダードとして、Hu IgG1 $\lambda$  Purified(The Binding Site)を用いた。

##### (ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヒトPT HrP(1-34) (ペプチド研究所)  $100 \mu\text{l}$ で固相化した。 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファー

でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100  $\mu$ lを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1 mg/mlの  
5 基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHrP(1-34)に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が $\lambda$ 鎖あるいは $\kappa$ 鎖のいずれであっても抗体のP  
10 THrP(1-34)に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 $\lambda$ 鎖を用いて構築した。

#### (6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

15 すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドMBC1HcDNA/pCHO1とMBC1L( $\lambda$ )/neoまたはMBC1HcDNA/pCHO1とMBC1L( $\kappa$ )/neoの組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、  
20 エタノール沈殿でDNAを回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に $1 \times 10^7$  細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10  $\mu$ gを加え、1,500V, 25  $\mu$ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)を添加したMEM- $\alpha$ 培地(GIBCO)に懸濁し、3枚の96穴プレート  
25 (Falcon)を用いてCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN(G418Sulfate、GIBCO)添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM- $\alpha$ 培地(GIBCO)の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後

に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラボトルにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 $\mu$ mのフィルター（Millipore）により細胞破片を除去した。

CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROSプロテインAカラム（PerSeptive Biosystems）を用いて、ConSep LC100（Millipore）にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

#### 〔参考例4〕ヒト型化抗体の構築

##### (1) ヒト型化抗体H鎖の構築

##### (i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体S31679(NBRF-PDB、Cuisinier A.M.ら、Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993)由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖（バージョン"a"）の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1（配列番号23）及びMBC1HGP3（配列番号24）はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1HGP2（配列番号25）及びMBC1HGP4（配列番号26）はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1HVS1（配列番号27）及びMBC1HVR1（配列番号28）はCDRグラフティングプライマーMBC1HGP1及びMBC1HGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）、ゲルからの抽出はcrush and soak法（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）を用いて行われた。

9)にて行った。

すなわち、それぞれ1 nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6 %変性ポリ  
リアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル  
薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20  $\mu$   
5 lの10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液に溶解した。PCRは、TaKaRa  
Ex Taq (宝酒造) を用い、100  $\mu$  lの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グ  
ラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1  
HGP4をそれぞれ1  $\mu$  l、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRaEx Taqを含む条件  
で添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の  
10 温度サイクルで5回行い、さらに50pmoleの外部プライマーMBC1HVS1及びM  
BC1HVR1を加え、同じ温度サイクルを30回行った。PCR法により増幅したDN  
A断片を4 %Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロー  
スゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit  
15 (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNA  
をエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4),1mM EDTA溶液20  $\mu$  l  
に溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することに  
より調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列  
を有するプラスミドをhMBCHv/pUC19と命名した。

## 20 (ii) ヒト型化H鎖cDNAのためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築した  
ヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV  
領域のリーダー配列の5'-側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozak  
コンセンサス配列(Kozak,M,ら、J.Mol.Biol.196,947-950,1987)、HindIIIおよび  
25 EcoRI認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーM  
BC1HVR2はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つC  
領域の5'-側の配列をコードしApaIおよびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq(宝酒造) を用い、鋳型DNAとして0.4  $\mu$  gのhMBCHv  
/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50

pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3% Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

- 5 456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4),1mM EDTA溶液20  $\mu$ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRIおよびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られ
- 10 たハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRIおよびHindIII認識配列及びKozak配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをhMBC1Hv/pUC19と命名した。

#### (2)ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

- hPM1抗体H鎖 cDNAの配列を含むプラスミドRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIにて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域C $\gamma$ 1を含み、5'-末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒト型化H鎖バージョン"a"の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。
- 15
- 20

- hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。
- 25

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCHO1



に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDN A/pCHO1と命名した。

### (3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築

#### (i) FR1,2/FR3,4ハイブリッド抗体の作製

- 5 ヒト型化抗体とマウス（キメラ）抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断部位を利用することによって、FR 1 及び 2 はヒト抗体由来、FR 3 及び 4 はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neo及びhMBC1L( $\lambda$ )/neo各10  $\mu$ gを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, AflIII（宝酒造）10Uを含有する反応混合液100  $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L( $\lambda$ )/neoから6282bpの断片(h1とする)および1022bpの断片(h2とする)を、GENECL  
15 EANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

回収したc 1、h 1断片各1  $\mu$ gについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液10  $\mu$ lに溶解した。

- 20 BAP処理したc 1及びh 1断片1  $\mu$ lをそれぞれh 2、c 2断片4  $\mu$ lに連結し（4℃、一夜）、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2 mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

- 25 精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, ApaLI(宝酒造) 2 U、またはBamHI(宝酒造)8U, HindIII(宝酒造)8Uを含有する反応混合液20  $\mu$ l中で37℃、1時間消化した。c 1-h 2が正しく連結されていれば、ApaLIで5560/1246/498bp、BamHI/HindIIIで7134/269bpの消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

これをヒトFR1,2/マウスFR3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをh/mMBC1L( $\lambda$ )/neoとした。一方、h1-c2のクローンが得られなかったの

で、pUCベクター上で組換えてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19、及びFR3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Ld $\lambda$

5 /pUC19を鋳型として用いた。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19、hMBC1La $\lambda$ /pUC19及びhMBC1Ld $\lambda$ /pUC19の各10 $\mu$ gを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, HindIII 16U, AflIII 4Uを含有する反応混合液30 $\mu$ l中で37℃、1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/pUC19から215bp(c2')、プラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19およびhMBC1Ld $\lambda$ /pUC19からそれぞれ3218bp(ha1',hd1')のDNA断片をGENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製した。

15 ha1'、hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドm/hMBC1La $\lambda$ /pUC19、m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19とした。

得られたプラスミドm/hMBC1La $\lambda$ /pUC19、m/hMBC1Ld $\lambda$ /pUC19をEcoRIで消化した。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20 $\mu$ lに溶解した。

25 各DNA断片4 $\mu$ lを前述のBAP処理したHEFベクター1 $\mu$ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100mM KCl, HindIII(宝酒造)8U, PvuI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20 $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、

プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウスFR1,2／ヒトFR3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hMBC1La $\lambda$ /neo、m/hMBC1Ld $\lambda$ /neoとした。

(ii)FR1／FR2ハイブリッド抗体の作製

- 5 CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neo及びh/mMBC1L( $\lambda$ )/neoの各10 $\mu$ gを10mM Tris-HCl(pH7.9), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, SnaBI(宝酒造)6Uを含有する反応混合液20 $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。次に2  
10 0mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01%(w/v)BSA, PvuI 6Uを含有する反応混合液50 $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。

反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L( $\lambda$ )/neoから4955bp(m1)および2349bp(m2)、プラスミドh/mMBC1L( $\lambda$ )/neoから4955bp(hm1)および2349bp(hm2)の各DNA断片をGENECLEANII Kit(BIO1  
15 01)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液40 $\mu$ lに溶解した。

m1、hm1断片1 $\mu$ lをそれぞれhm2、m2断片4 $\mu$ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する2 $\times$ YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラス  
20 ミドを精製した。

精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, ApaI(宝酒造)8U、またはApaLI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20 $\mu$ l中で37℃にて1時間消化した。

各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaLIで5560/1246/498bp(m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaLIで3535/2025/1246/498bp (hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒトFR1／マウスFR2,3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmmMBC1L( $\lambda$ )/neo、マウスFR1／ヒトFR2／マウスFR3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをmhmMBC1L( $\lambda$ )/neoとした。

#### (4) ヒト型化抗体 L 鎖の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体 L 鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体HSU03868(GEN-BANK、Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来のFR1、FR2およびFR3、並びにヒト抗体S25755(NB RF-PDB)由来のFR4を有するヒト型化#23-57-137-1抗体 L 鎖 (バージョン"a")  
5 の作製のために 6 個のPCRプライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1(配列番号29)及びMBC1LGP3(配列番号30)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1LGP2(配列番号31)及びMBC1LGP4(配列番号32)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。  
10 外部プライマーMBC1LVS1(配列番号33)及びMBC1LVR1(配列番号34)はCDRグラフティングプライマーMBC1LGP1及びMBC1LGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。  
15

すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20μlの10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mMEDTA溶液に溶解した。  
20

PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100μlの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4をそれぞれ1μl、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、この反応混合液に50pmoleの外部プライマーMBC1LVS1及びMBC1LVR1を加え、さらに同じ温度サイクルで30回反応させた。PCR法により増幅したDNA断片を3% Nu Sieve GTGアガロース(F  
25

MC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR 反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサ

5 ブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドをhMBC  
L/pUC19と命名した。しかしながらCDR4の104位(Kabatの規定によるアミノ酸  
番号96位)のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正  
するための修正プライマーMBC1LGP10R(配列番号35)を設計し、合成した。PC  
RはTaKaRa Taq(宝酒造)を用い、100 $\mu$ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 $\mu$   
10 gのプラスミドhMBCL/pUC19、プライマーとしてMBC1LVS1及びMBC1LGP1  
0Rをそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)0.25mMのdNTPを含  
む条件で添付の緩衝液を使用して50 $\mu$ lの鉱油を上層して94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ C  
にて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅  
したDNA断片を3% Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いた  
15 アガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

20 M13 Primer M4プライマー及びM13 Primer RVプライマーを用いて塩基配  
列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドをHin  
dIIIおよびBlnIで消化し、416bpの断片を1%アガロースゲル電気泳動により分  
離した。GENECLEANII Kit(BIO101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断  
片を精製した。得られたPCR反応混合物をHindIIIおよびBlnIで消化することに  
25 より調製したプラスミドCλ/pUC19に導入し、プラスミドhMBC1Laλ/pUC1  
9と命名した。このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列  
を含む配列をプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型  
化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhM  
BC1Laλ/pCOS1と命名した。ヒト型化L鎖バージョン"a"の塩基配列（対応す

るアミノ酸を含む)を配列番号66に示す。また、バージョン a のアミノ酸配列を配列番号47に示す。

バージョン"b"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"b"では43位(Kabatの規定によるアミノ酸番号43位)のグリシンをプロリンに、49位  
5 (Kabatの規定によるアミノ酸番号49位)のリジンをアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R(配列番号36)とプライマーMBC1LVS1によりプラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI, HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIIで消  
10 化し、HindIIIおよびAflIIIで消化したhMBC1La $\lambda$ /pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb $\lambda$ /pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb $\lambda$ /pCOS1と命名した。

バージョン"c"をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン"c"では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13  
15 Primer RVによりプラスミドhMBC1La $\lambda$ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで  
20 消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1La $\lambda$ /pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc $\lambda$ /pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1  
25  $\alpha$ プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc $\lambda$ /pCOS1と命名した。

バージョン"d"、"e"及び"f"をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に"a"、"b"、"c"バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。

変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーM-S1 (配列番号44) によりそれぞれhMBC1La  $\lambda$  /pCOS1, hMBC1Lb  $\lambda$  /pCOS1, hMBC1Lc  $\lambda$  /pCOS1を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクロ

5 ニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したC  $\lambda$  /pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ld  $\lambda$  /pUC19、hMBC1Le  $\lambda$  /pUC19、hMBC1Lf  $\lambda$  /pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、E

10 F1 $\alpha$  プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ld  $\lambda$  /pCOS1、hMBC1Le  $\lambda$  /pCOS1、hMBC1Lf  $\lambda$  /pCOS1と命名した。

バージョン" g " 及び" h " をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に" a " 、" d " バージョンの36位(Kabatの規定によるアミノ酸番号

15 36位) のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP9R(配列番号39)およびM13 Primer RVをプライマーとして用いて、hMBC1La  $\lambda$  /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1La  $\lambda$  /pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindI

20 IIおよびBlnIで消化することで調製したプラスミドC  $\lambda$  /pUC19にサブクロニングした。このプラスミドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R(配列番号40)とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1La  $\lambda$  /pUC19およびhMBC1Ld  $\lambda$  /pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配

25 列を含むプラスミドを順にhMBC1Lg  $\lambda$  /pUC19およびhMBC1Lh  $\lambda$  /pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 $\alpha$  プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lg  $\lambda$  /pCOS1およびhMBC1Lh  $\lambda$  /pCOS1と命名した。

バージョン"i"、"j"、"k"、"l"、"m"、"n" および"o" をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号41)とプライマーV1RV( $\lambda$ )(配列番号43)によりプラスミドhMBC1La  $\lambda$ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1Lg  $\lambda$ /pUC19にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx  $\lambda$ /pUC19 (x = i, j, k, l, m, n, o) とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 $\alpha$ プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x = i, j, k, l, m, n, o) と命名した。バージョン"j"、"l"、"m" および"o"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

バージョン"p"、"q"、"r"、"s" および"t" は、バージョン"i"、"j"、"m"、"l" または"o" のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン"h" を、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l" または"o" とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミドhMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x = i, j, m, l, o) 中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1Lh  $\lambda$ /pCOS1中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l" および"o" の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r" および"t" とし、得られたプラスミドをhMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x = p, q, s, r, t) と命名した。バージョン"q"、"r"、"



s" および"t" の塩基配列（対応するアミノ酸を含む）をそれぞれ配列番号71、72、73、74に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号52、53、54、55に示す。

プラスミドhMBC1Lq $\lambda$ /pCOS1をHindIIIおよびEcoRIで消化し、HindIIIおよびEcoRIで消化したプラスミドpUC19にサブクローニングし、プラスミドhMBC1Lq $\lambda$ /pUC19と命名した。

ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表2に示す。

表 2

バージョン	3 6	4 3	4 5	4 7	4 9	8 0	8 7
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

10 表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。

なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19およびhMBC1Lq $\lambda$ /pUC19を有する大腸菌はEscherichia coli JM109(hMBC1HcDNA/pUC19)および Escherichia coli JM109(hMBC1Lq $\lambda$ /pUC19)として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109 (hMBC1Lq $\lambda$ /pUC19)についてはFERM BP-5630と

してブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### (5)COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

- すなわちL鎖ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミド hMBC1HcDNA/pCOS1とh/mMBC1L( $\lambda$ )/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1La  $\lambda$ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1Ld  $\lambda$ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L( $\lambda$ )/neo、またはhMBC1HcDNA/pCOS1とmhmMBC1L( $\lambda$ )/neoとの組み合わせを、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に  $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA  $10 \mu\text{g}$ を加え、1,500V,  $25 \mu\text{F}$ の静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

- ヒト型化#23-57-137-1抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 ( $x = a \sim t$ )のいずれかの組み合わせをGene Pulser装置(Bio Rad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSIIキット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

#### (6)ELISA

- (i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp,NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)で  $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100  $\mu\text{l}$ で固相化し、200  $\mu\text{l}$ の希釈バッファー(50mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M Na

Cl, 0.05% Tween20, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 1% 牛血清アルブミン(BSA), pH7.2) でブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 $\mu$ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスランダーとして、Hu IgG1 $\lambda$  Purified(The Binding Site)を用いた。

#### 10 (ii)抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1 $\mu$ g/mlの濃度に調製したヒトPTHrP(1-34) 100 $\mu$ lで固相化した。200 $\mu$ lの希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO) 100 $\mu$ lを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

#### (7)活性確認

##### (i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン"a"とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン"a"で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン"a"をヒト型化抗体のH鎖として供した。

##### (ii)ハイブリッド抗体の活性

##### (ii-a) FR1,2/FR3,4ハイブリッド抗体

L鎖がh/mMBC1L( $\lambda$ )の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1La

λあるいはm/hMBC1Ldλの場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR3,4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1,2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(ii-b) FR1/FR2ハイブリッド抗体

- 5 L鎖がmhmMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L(λ)の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(iii) ヒト型化抗体の活性

- 10 L鎖としてバージョン"a"から"t"の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン"j"、"l"、"m"、"o"、"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHrP結合能を示した。

(8) CHO安定産生細胞株の樹立

- 15 ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

- すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lmλ/pCOS1またはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lqλ/pCOS1あるいはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lrλ/pCOS1の
- 20 組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に $1 \times 10^7$ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10μg
- 25 を加え、1,500V、25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)添加、MEM-α培地(GIBCO)に懸濁し、96穴プレート(Falcon)を用いてCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate、GIBCO) 添加、リボヌクレ

オシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM- $\alpha$ 培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

- 5 樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラボトルにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM- $\alpha$ 培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 $\mu$ mのフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。

- CHO細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROSプロテインAカラム(PerSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100(Millipore)にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

#### 〔参考例5〕中和活性の測定

- 15 マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、10%牛胎児血清(GIBCO)を含むHam's F-12培地(GIBCO)中にて、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5細胞を96穴プレートに10<sup>4</sup>細胞/100 $\mu$ l/穴で蒔込み1日間培養し、4mMのHydrocortisoneと10%牛胎児血清を含むHam's F-12培地(GIBCO)に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260 $\mu$ lのHam's F-12培地(GIBCO)にて洗浄し、1mMのイソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx, SIGMA)および10%の牛胎児血清と10mMのHEPESを含む80 $\mu$ lのHam's F-12を加え、30分間37°Cでインキュベートした。

- 中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10 $\mu$ g/ml、3.3 $\mu$ g/ml、1.1 $\mu$ g/mlおよび0.37 $\mu$ g/mlの群、10 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/mlおよび0.01 $\mu$ g/mlの群、または10 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、1.25 $\mu$ g/ml、0.63 $\mu$ g/mlおよび0.31 $\mu$ g/mlの群に段階希釈し、4ng/mlに調製したPTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体とPTHrP(1-34)の混合液80 $\mu$ lを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP(1-34)の濃度は1ng/mlにな

る。10分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄したした後、100 $\mu$ lの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)付属のEIAバッファ120 $\mu$ lを添加しcAMPを抽出後、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)添付の処方に従ってcAMPを測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した。

10

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

15 配列番号 4 : 合成DNA

配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成DNA

20 配列番号 9 : 合成DNA

配列番号10 : 合成DNA

配列番号11 : 合成DNA

配列番号12 : 合成DNA

配列番号13 : 合成DNA

25 配列番号14 : 合成DNA

配列番号15 : 合成DNA

配列番号16 : 合成DNA

配列番号17 : 合成DNA

配列番号18 : 合成DNA

- 配列番号19：合成DNA  
配列番号20：合成DNA  
配列番号21：合成DNA  
配列番号22：合成DNA  
5 配列番号23：合成DNA  
配列番号24：合成DNA  
配列番号25：合成DNA  
配列番号26：合成DNA  
配列番号27：合成DNA  
10 配列番号28：合成DNA  
配列番号29：合成DNA  
配列番号30：合成DNA  
配列番号31：合成DNA  
配列番号32：合成DNA  
15 配列番号33：合成DNA  
配列番号34：合成DNA  
配列番号35：合成DNA  
配列番号36：合成DNA  
配列番号37：合成DNA  
20 配列番号38：合成DNA  
配列番号39：合成DNA  
配列番号40：合成DNA  
配列番号41：合成DNA  
配列番号42：合成DNA  
25 配列番号43：合成DNA  
配列番号44：合成DNA

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する低バソプレシン濃度改善剤が提供される。また

- 5 、本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含むバソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善剤が提供される。

上記物質の投与により、低バソプレシン濃度モデルにおける血中バソプレシン濃度の改善及び多尿の症状等の改善が認められたことから、上記物質は低バソプ

- 10 レシン濃度改善剤として有用である。



## 請 求 の 範 囲

1. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、低バソプレシン濃度改善剤。
- 5 2. 物質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニストである請求項 1 記載の改善剤。
3. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体である請求項 1 記載の改善剤。
4. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び／又はその修飾物である請求項 1 記載の改善剤。
- 10 5. 抗体がヒト型化又はキメラ化されたものである請求項 3 又は 4 記載の改善剤。
6. ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1抗体である請求項 5 記載の改善剤。
7. 抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 又は 4 記載の改善剤。
8. 低バソプレシン濃度が癌に起因するものである請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の改善剤。
- 15 9. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、バソプレシン濃度の低下に起因する症状の改善剤。
- 10 10. バソプレシン濃度の低下が癌に起因するものである請求項 9 記載の改善剤。
- 11 11. バソプレシン濃度の低下に起因する症状が、多尿症、脱水症、口渇感及び高浸透圧血症からなる群から選択される少なくとも 1 種である請求項 9 又は 10
- 20 記載の改善剤。
12. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、高浸透圧血症の改善剤。
13. 高浸透圧血症が嘔吐、下痢、発熱、発汗、尿崩症又は糖尿病によって併発するものである請求項 12 記載の改善剤。
- 25 14. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、脱水症の改善剤。
- 15 15. 脱水症が嘔吐、下痢、発熱、発汗、尿崩症又は糖尿病によって併発するものである請求項 14 記載の改善剤。



図 1

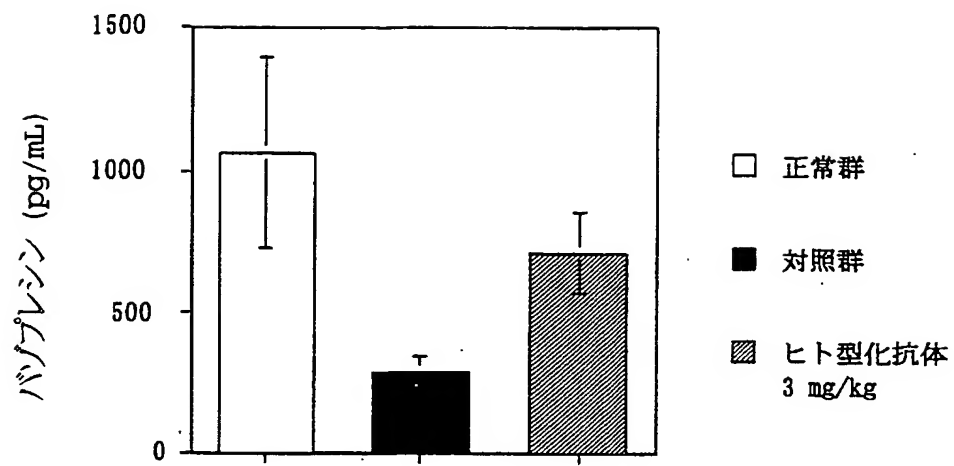


図 2

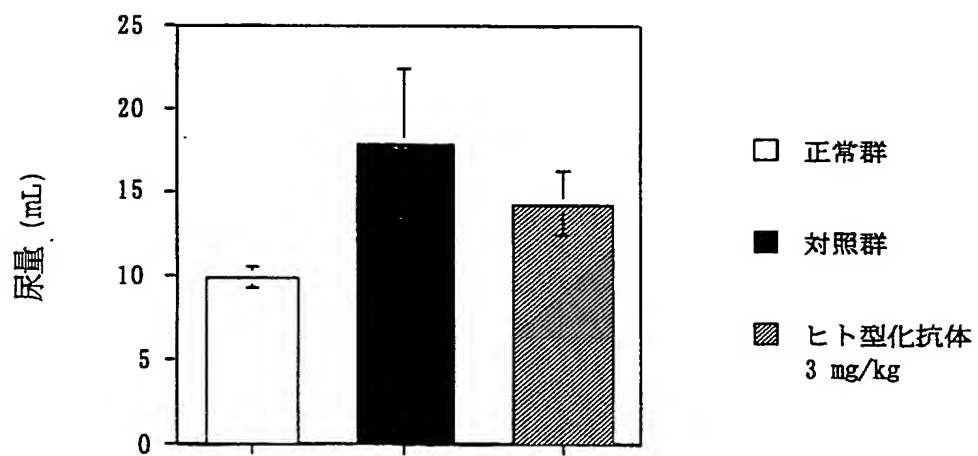




図 3

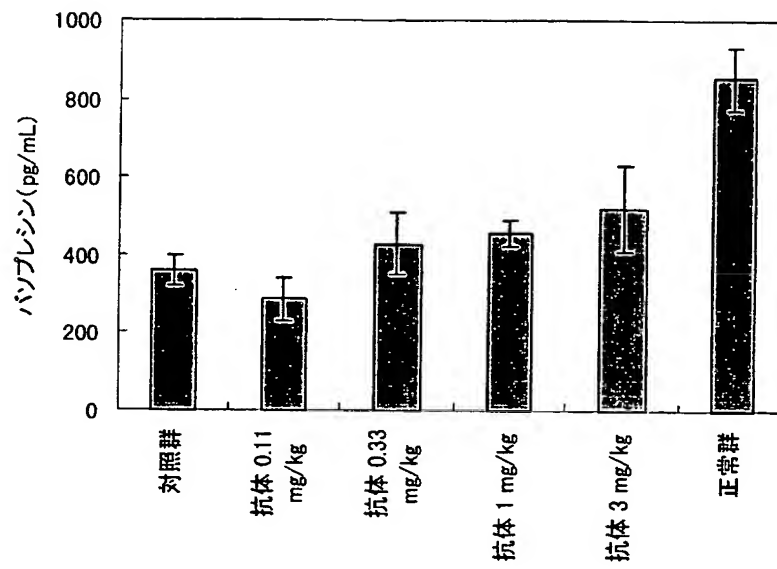
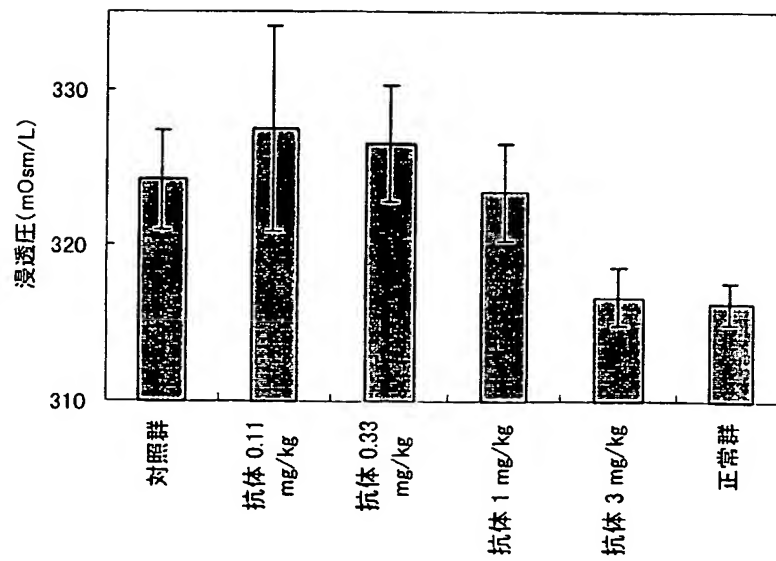


図 4





## SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Ameliorative agent for low vasopressin concentration

<130> PH-944-PCT

<150> JP 11-189322

<151> 1999-07-02

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

aaatagccct tgaccaggca

20

<210> 2

<211> 38





<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

ctggttcggc ccacctctga aggttccaga atcgatag

38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ggatcccggg ccagtgata gacagatg

28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4



ggatcccggg tcagrggaag gtggraaca

29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gttttcccag tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

gtctaagctt ccacatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

tgttggatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttcac catggggttt gggctg

36

<210> 10



<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tttcccgggc ccttggtgga ggctgaggag acggtgacca g 41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gtctgaattc aagcttagta ctgggccagc ccaaggccaa cccacggtc accctgttcc 60  
cgccctctc tgaggagctc caagccaaca aggccacact agtgtgtct 109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA





<400> 12

ggtttggagg tctccactcc cgccttgacg gggctgccat ctgccttcca ggccactgtc 60  
acagctcccg ggtagaagtc actgatcaga cacactagtg tggccttggt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

ggagtggaga ccaccaaacc ctccaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 60  
ctgagcctga cgcccgagca gtggaagtcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

tgttgaattc ttactatgaa cattctgtag gggccactgt ctctccacg gtgtccctt 60  
catgcgtgac ctggcagctg tagcttctgt gggacttcca ctgctc 106



<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccc 43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tggtgaattc ttactatgaa 20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 17

caacaagtac gcggccagca gctacctgag cctgacgcc 39

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtagctgctg gccgcgtact tgttggtgct ctgtttgga 39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gtctgaattc aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc 46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

tgttgaattc ttactaacac tctcccctgt tgaa

34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

gtctaagctt ccacatggc ctggactcct ctctt

35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

tgttgaattc agatctaact acttacctag gacagtgacc ttggtccc

48





<210> 23

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

```
gtctaagctt ccaccatggg gtttgggctg agctgggttt tcctcgttgc tcttttaaga 60
ggtgtccagt gtcaggtgca gctggtggag tctgggggag gcgtggtcca gcctgggagg 120
tccctgag                                     128
```

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

```
accattagta gtggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg gcgattcacc 60
atctccagag acaattccaa gaacacgctg taictgcaaa tgaacagcct gagagctgag 120
gacac                                     125
```

<210> 25

<211> 132



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

ctaccaccac tactaatggt tgccaccac tccagcccct tgcctggagc ctggcggacc 60  
caagacatgc catagctact gaaggtgaat ccagaggctg cacaggagag tctcagggac 120  
ctcccaggct gg 132

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

tggtggatcc ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccagtaagc aaagtaagtc 60  
atagtagtct gtctgcaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag 110

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Synthetic DNA

<400> 27

gtctaagctt ccacatggg gtttgggctg 30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg 30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

acaaagcttc caccatggcc tggactcctc tcttcttctt cttgttctt cattgtcag 60  
gttctttctc ccagcttgtg ctgactcaat cgccctctgc ctctgcctcc ctgggagcct 120  
cggtaagct cac 133



<210> 30

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acaggatgatg ggattcctga tcgcttctca ggcctccagct 60  
ctggggctga gcgctacctc accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

ctgtggcttc catcttgctt aagtttcatc aagtaccgag ggcccttctc tggctgctgc 60  
tgatgccatt caatggtgta cgtactgtgc tgactactca aggtgcaggt gagcttgacc 120  
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence





<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttggtccct ccgccgaaca ccttcacaaa 60  
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcatcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

acaaagcttc caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

cttggatccg ggctgacct 19



<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

cttggatcgc ggctgacctt ggacggctcag ttgggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60  
ttgttcctta attgt 75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

aaaggatcct taagatccat caagtaccga gggggcttct ctg 43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 37

acaaagctta gcgctacctic accatctcca gcctccagcc tgagga 46

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 38

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttiggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60  
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gatatagtca gcctcatcct c 111

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 39

cttctctggc tgctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct 42



<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

cgagggccct tctctggctg ctgctg

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawcctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA





&lt;400&gt; 42

cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg

35

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 43

ggcttggagc tcctcaga

18

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 44

gacagtggtt caaagttttt

20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT



&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 45

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser

65 70 75 80

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr



20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 47

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met  
 35 40 45  
 Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser



65                      70                      75                      80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
                          85                      90                      95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
                          100                      105                      110  
 Thr Val Leu Gly  
                          115

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 48

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
   1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
                          20                      25                      30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met  
                          35                      40                      45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
                          50                      55                      60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
   65                      70                      75                      80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp  
                          85                      90                      95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
                          100                      105                      110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro





115

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens



&lt;400&gt; 50

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 51

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30



Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35

40

45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85

90

95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

105

110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 52

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20

25

30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met

35

40

45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80



Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85

90

95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

105

110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 53

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20

25

30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met

35

40

45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65

70

75

80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85

90

95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

105

110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115





&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met  
 35 40 45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens



&lt;400&gt; 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met  
 35 40 45  
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp  
 85 90 95  
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 115

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val



35                      40                      45  
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85                      90                      95  
 Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100                      105                      110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt      48  
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

-15

-10

-5



gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96  
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys  
           -1   1                  5                  10  
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144  
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
           15                  20                  25  
 agt agc tat ggc atg tct tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg 192  
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu  
           30                  35                  40                  45  
 gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240  
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
                   50                  55                  60  
 gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
                   65                  70                  75  
 acc cta tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg 336  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met  
           80                  85                  90  
 ttt tac tgt gca aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384  
 Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly  
           95                  100                  105  
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
           110                  115

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens





&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 58

```

atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
      -15          -10          -5

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
      -1  1          5          10

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15          20          25

agt agc tat ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      30          35          40          45

gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
      50          55          60

gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
      65          70          75

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg 336

```



Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

80

85

90

tat tac tgt gcg aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly

95

100

105

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1

5

10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 60

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1

5

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 9



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tct ttc tcc caa ctt gtg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

-1 1 5 10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag caa cag cca ctc aag cct cct aag 192





Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys  
 30 35 40 45  
 tat gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
 50 55 60  
 att cct gat cgc ttc tct gga tcc agc tct ggt gct gat cgc tac ctt 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu  
 65 70 75  
 agc att tcc aac atc cag cca gaa gat gaa gca atg tac atc tgt ggt 336  
 Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly  
 80 85 90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tat gtt ttc ggc ggt ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 acc aag gtc act gtc cta ggt cag ccc 411  
 Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide



&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 66

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt	48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly	
-15 -10 -5	
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc	96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser	
-1 1 5 10	
ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt	144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser	
15 20 25	
acg tac acc att gaa tgg cat cag cag cag cca gag aag ggc cct cgg	192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg	
30 35 40 45	
tac ttg atg aaa ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240
Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly	
50 55 60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc	288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu	
65 70 75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt	336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly	
80 85 90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg	384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly	
95 100 105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggt cag ccc	411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	



110

115

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 67

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30          35          40          45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

```



Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
                     50                    55                    60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
                     65                    70                    75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
                     80                    85                    90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
                     95                    100                    105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110                    115

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 68





atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly  
                   -15                  -10                  -5  
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96  
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
           -1   1                  5                  10  
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144  
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
           15                  20                  25  
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192  
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys  
   30                  35                  40                  45  
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
                   50                  55                  60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
                   65                  70                  75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
                   80                  85                  90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
           95                  100                  105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
   110                  115

&lt;210&gt; 69



&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 69

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
      -15          -10          -5
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10
ctg gga gcc tgg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
      30          35          40          45
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
      50          55          60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288

```



Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
                   65                  70                  75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
                   80                  85                  90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
                   95                  100                  105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110                  115

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 70

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15

-10

-5



tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96  
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
           -1   1                      5                      10  
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144  
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
           15                      20                      25  
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192  
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
           30                      35                      40                      45  
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
                       50                      55                      60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
                       65                      70                      75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly  
                       80                      85                      90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
           95                      100                      105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110                      115

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens





&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 71

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt	48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly	
-15 -10 -5	
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc	96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser	
-1 1 5 10	
ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt	144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser	
15 20 25	
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag	192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys	
30 35 40 45	
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly	
50 55 60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc	288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu	
65 70 75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt	336



Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
           80                    85                    90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
           95                    100                    105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110                    115

<210> 72  
 <211> 411  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(411)

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (58)..(411)

<400> 72  
 atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48  
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly  
                     -15                    -10                    -5  
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96  
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser  
           -1   1                    5                    10



ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144  
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser  
 15 20 25  
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192  
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 30 35 40 45  
 tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
 50 55 60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
 65 70 75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
 80 85 90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS



&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 73

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt  48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc  96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt  144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag  192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30          35          40          45

tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg  240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
          50          55          60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc  288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
          65          70          75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt  336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
          80          85          90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg  384

```





Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95

100

105

acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc

411

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110

115

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (58)..(411)

&lt;400&gt; 74

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15

-10

-5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

-1 1

5

10

ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15

20

25



acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192  
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg  
 30 35 40 45  
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240  
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly  
 50 55 60  
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288  
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu  
 65 70 75  
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336  
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly  
 80 85 90  
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384  
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 75

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
 20 25 30



Thr Ala



—

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	OGATA. E, 'Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity', CANCER, 15 January, 2000 (15.01.00), Vol.88, Supplement Issue No.12, pp.2909-2911	1-5, 7-15
X	WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Full text & EP, 962467, A1 & JP, 11-92500, A	1-15
Y	JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92), Full text (Family: none)	1-5, 7-15
Y	WO, 92/17602, A1 (THE GENARAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS), 15 October, 1992 (15.10.92), Full text; especially, Claims 34-35 & EP, 579758, A1 & JP, 6-506598, A	1-2, 8-15
Y	WO, 92/753, A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23 January, 1992 (23.01.92), Full text	1-2, 8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 September, 2000 (19.09.00)

Date of mailing of the international search report  
03 October, 2000 (03.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 539491, A1 & JP, 5-509098, A	
Y	US, 5001223, A (MERCK & Co., Inc), 19 March, 1991 (19.03.91), Full text & EP, 293160, A2 & JP, 64-13100, A	1-2,8-15
Y	JP, 7-165790, A (TONEN CORPORATION), 27 June, 1995 (27.06.95), Full text (Family: none)	1-2,8-15
Y	JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90), Full text (Family: none)	1-2,8-15
Y	JP, 7-316195, A (NIPPON KAYAKU CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95), Full text (Family: none)	1-2,8-15



**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-2  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  

A person skilled in the art cannot fully understand what substances are included in the scopes of "a substance capable of inhibiting the binding of a parathyroid hormone-associated peptide to its receptor" and "an antagonist against a parathyroid hormone-associated peptide receptor". Therefore, any meaningful international search can be performed but on the substances particularly disclosed in the description of the present application.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2000年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2000年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS (STN) BIOSIS (STN)  
 REGISTRY (STN) EMBASE (STN)  
 MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	OGATA. E, 'Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity', CANCER, 15. 1月. 2000 (15. 01. 00)、第88巻、 12Suppl号、pp 2909-2911	1-5, 7-15
X	WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社) 2. 4月. 1 998 (02. 04. 98) 全文 & EP, 962467, A1 & JP, 11-92500, A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社) 18. 8 月. 1992 (18. 08. 92) 全文 (ファミリーなし)	1-5, 7-15
Y	WO, 92/17602, A1 (THE GENARAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS) 15. 10月. 19 92 (15. 10. 92) 全文、特に請求項34-35 & EP, 579758, A1 & J P, 6-506598, A	1-2, 8-15
Y	WO, 92/753, A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23. 1月. 1992 (23. 01. 92) 全文 & EP, 539491, A1 & J P, 5-509098, A	1-2, 8-15
Y	US, 5001223, A (MERCK & Co., Inc) 19. 3月. 19 91 (19. 03. 91) 全文 & EP, 293160, A2 & J P, 64-13100, A	1-2, 8-15
Y	J P, 7-165790, A (東燃株式会社) 27. 6月. 199 5 (27. 06. 95) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15
Y	J P, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社) 16. 8 月. 1990 (16. 08. 90) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15
Y	J P, 7-316195, A (日本化薬株式会社) 5. 12月. 1 995 (05. 12. 95) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-2 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
「副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質」及び「副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト」との記載は、当該物質にどのような物質が含まれるのかを当業者が十分に理解することができないため、本願明細書に具体的に開示されているものを除き、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[ P C T 1 8 条、P C T 規則43、44 ]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-944-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04413	国際出願日 (日.月.年) 03.07.00	優先日 (日.月.年) 02.07.99
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第        図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (P C T 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-2 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
「副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質」及び「副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト」との記載は、当該物質にどのような物質が含まれるのかを当業者が十分に理解することができないため、本願明細書に具体的に開示されているものを除き、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって P C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A 6 1 K 4 5 / 0 0, A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A 6 1 K 4 5 / 0 0, A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS (STN)

BIOSIS (STN)

REGISTRY (STN)

EMBASE (STN)

MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	OGATA. E, 'Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity', CANCER, 15. 1月. 2000 (15. 01. 00)、第88巻、 12Suppl号、pp 2909-2911	1-5, 7-15
X	WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社) 2. 4月. 1 998 (02. 04. 98) 全文 & EP, 962467, A1 & JP, 11-92500, A	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4 C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3450



C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社) 18. 8月. 1992 (18. 08. 92) 全文 (ファミリーなし)	1-5, 7-15
Y	WO, 92/17602, A1 (THE GENARAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS) 15. 10月. 1992 (15. 10. 92) 全文、特に請求項34-35 & EP, 579758, A1 & J P, 6-506598, A	1-2, 8-15
Y	WO, 92/753, A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23. 1月. 1992 (23. 01. 92) 全文 & EP, 539491, A1 & J P, 5-509098, A	1-2, 8-15
Y	US, 5001223, A (MERCK & Co., Inc) 19. 3月. 1991 (19. 03. 91) 全文 & EP, 293160, A2 & J P, 64-13100, A	1-2, 8-15
Y	J P, 7-165790, A (東燃株式会社) 27. 6月. 1995 (27. 06. 95) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15
Y	J P, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社) 16. 8月. 1990 (16. 08. 90) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15
Y	J P, 7-316195, A (日本化薬株式会社) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95) 全文 (ファミリーなし)	1-2, 8-15



127  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

10/019501

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-944-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04413	International filing date (day/month/year) 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 39/395, A61P 5/10, 7/12, 13/12		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 July 2000 (03.07.00)	Date of completion of this report 08 March 2001 (08.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-2

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-2  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

The description of "a substance capable of inhibiting the binding between a parathyroid hormone-associated peptide and its receptor" and "an antagonist against a parathyroid hormone-associated peptide receptor" does not allow a person skilled in the art to sufficiently understand what substances are included in these substances. So, a significant international preliminary examination cannot be made, except for the matters particularly disclosed in the specification of the present application.

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-2

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	3-15	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	3-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	3-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### Documents

- Document 1: WO, 98-13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 2 April, 1998 (02.04.98)  
 Document 2: JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92)  
 Document 3: WO, 92-17602, A1 (The General Hospital Corporation Office of Technology Affairs), 15 October, 1992 (15.10.92)  
 Document 4: WO, 92-753, A1 (The Regents of the University of California), 23 January, 1992 (23.01.92)  
 Document 5: US, 5001223, A (Merck & Co., Inc.), 19 March, 1991 (19.03.91)  
 Document 6: JP, 7-165790, A (Tonen Corp.), 27 June, 1995 (27.06.95)  
 Document 7: JP, 2-207099, A (Tonen Corp.), 16 August, 1990 (16.08.90)  
 Document 8: JP, 7-316195, A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 5 December, 1995 (05.12.95)

#### Explanation

##### Claims 1-15

Document 1 describes that anti-PTHrP humanized #23-57-137-1 antibody is used as an agent for ameliorating symptoms caused by malignant tumors such as hydrodipsia and emesis. So, the subject matters of claims 1-15 do not appear to be novel.

##### Claims 1-15

Document 2 describes an anti-PTHrP monoclonal antibody.

Document 3 describes a method of screening a compound inhibiting the binding between PTHrP and its receptor, and a drug containing said compound.

Document 4 describes a peptide analogue having antagonist activity against PTHrP.

Document 5 describes a PTH analogue having PTHrP receptor antagonist activity.

Documents 6-8 respectively describe a polypeptide not having human PTHrP activity but having human PTHrP antagonist activity.

Therefore, it is obvious to a person skilled in the art, to use a monoclonal antibody, polypeptide analogue or the like described in documents 2-8 that acts to inhibit the binding between PTHrP and its receptor instead of the humanized anti-PTHrP monoclonal antibody, and that also inhibits the binding between PTHrP and its receptor described in document 1.

So, the subject matters of claims 1-15 do not appear to involve an inventive step.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAS (STN) BIOSIS (STN)  
REGISTRY (STN) EMBASE (STN)  
MEDLINE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	OGATA. E, 'Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity', CANCER, 15 January, 2000 (15.01.00), Vol.88, Supplement Issue No.12, pp.2909-2911	1-5, 7-15
X	WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Full text & EP, 962467, A1 & JP, 11-92500, A	1-15
Y	JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92), Full text (Family: none)	1-5, 7-15
Y	WO, 92/17602, A1 (THE GENARAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS), 15 October, 1992 (15.10.92), Full text; especially, Claims 34-35 & EP, 579758, A1 & JP, 6-506598, A	1-2, 8-15
Y	WO, 92/753, A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23 January, 1992 (23.01.92), Full text	1-2, 8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 September, 2000 (19.09.00)

Date of mailing of the international search report  
03 October, 2000 (03.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



.

.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04413

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 539491, A1 & JP, 5-509098, A	
Y	US, 5001223, A (MERCK & Co., Inc), 19 March, 1991 (19.03.91); Full text & EP, 293160, A2 & JP, 64-13100, A	1-2,8-15
Y	JP, 7-165790, A (TONEN CORPORATION), 27 June, 1995 (27.06.95), Full text (Family: none)	1-2,8-15
Y	JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90), Full text (Family: none)	1-2,8-15
Y	JP, 7-316195, A (NIPPON KAYAKU CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95), Full text (Family: none)	1-2,8-15



IST

REC'D 26 MAR 2001

/IPO

PCT

特 許 協 力 条 約

10/019501

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT 36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-944-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04413	国際出願日 (日.月.年) 03.07.00	優先日 (日.月.年) 02.07.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 39/395 A61P5/10, 7/12, 13/12		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT 36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  
I ☒ 国際予備審査報告の基礎  
II ☐ 優先権  
III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  
IV ☐ 発明の単一性の欠如  
V ☒ PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  
VI ☐ ある種の引用文献  
VII ☐ 国際出願の不備  
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 03.07.00	国際予備審査報告を作成した日 08.03.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460	4C 2938



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☒ 請求の範囲 1 - 2

☐ この国際出願又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際予備審査をすることを要しない  
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

- ☒ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 1-2 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

「副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質」及び「副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニスト」との記載は当該物質にどのような物質が含まれるのかを当業者が十分に理解することができないため、本願明細書に具体的に開示されているものを除き、有意義な国際予備審査をすることができない。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 1-2 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

請求の範囲

3-15

有

無

進歩性 (IS)

請求の範囲

請求の範囲

3-15

有

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

請求の範囲

3-15

有

無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

## 文献

文献1 : WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社) 2. 4月. 1998 (02. 04. 98)

文献2 : JP, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社) 18. 8月. 1992 (18. 08. 92)

文献3 : WO, 92/17602, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS) 15. 10月. 1992 (15. 10. 92)

文献4 : WO, 92/753, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23. 1月. 1992 (23. 01. 92)

文献5 : US, 5001223, A (MERCK &amp; Co., Inc) 19. 3月. 1991 (19. 03. 91)

文献6 : JP, 7-165790, A (東燃株式会社) 27. 6月. 1995 (27. 06. 95)

文献7 : JP, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社) 16. 8月. 1990 (16. 08. 90)

文献8 : JP, 7-316195, A (日本化薬株式会社) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95)

## 説明

請求の範囲1-15について

文献1には、抗PTHrPヒト型化#23-57-137-1抗体を、口渇感や嘔吐等の悪性腫瘍に起因する症状の改善剤として用いられることが記載されている。したがって、本願の請求の範囲1-15に記載の発明は新規性を有さない。



補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

請求項 1-15 について

文献 2 には、抗 PTHrP モノクローナル抗体が記載されている。

文献 3 には、PTHrP とその受容体との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法と当該化合物を配合した医薬が記載されている。

文献 4 には、PTHrP に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド類似体が記載されている。

文献 5 には、PTHrP 受容体アンタゴニスト活性を有する PTH 類似体が記載されている。

文献 6-8 には、ヒト PTHrP 活性を有さず、ヒト PTHrP アンタゴニスト活性を有するポリペプチドが記載されている。

したがって、文献 1 に記載の、PTHrP とその受容体との結合を阻害するヒト型化抗 PTHrP モノクローナル抗体に代えて、同じく PTHrP とその受容体との結合を阻害する作用を奏する文献 2-8 に記載のモノクローナル抗体やポリペプチド類似体等を用いることは当該技術分野の専門家にとって自明である。

よって、本願の請求の範囲 1-15 に記載の発明は進歩性を有しない。



INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
 Representative: Osamu Nagayama  
 Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (MBC1L24)	Accession Number: FERM BP-5627
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s). <input checked="" type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on _____ (date of the original deposit), and received on _____, a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology  Representative: Michio Ohishi (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL.  Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan  Date: August 15, 1996	

7

1. 1. 1.

1. 1. 1.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

### 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

寄託者

取締役社長

永山 治

あて名

〒

115

東京都北区浮間5丁目5番1号

殿

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

#### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)

(受託番号)

FERM BP- 5627

#### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

#### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。

#### 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
そして、 年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。  
日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

#### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Oishi, DIRECTOR GENERAL

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN.

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日





INTERNATIONAL FORM

(translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
Representative: Osamu Nagayama  
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (MBC1H04)	Accession Number: FERM BP-5628
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).	
<input type="checkbox"/> A Scientific Property <input type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on (date of the original deposit), and received on , a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology  Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL.  Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan  Date: August 15, 1996	



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

取締役社長

永山 治

寄託者

あて名

〒

115

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

殿

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04)

(受託番号)

FERM BP- 5628

### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

### 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
そして、  
年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。  
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Ohtsu, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN.

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日



INTERNATIONAL FORM

(translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
Representative: Osamu Nagayama  
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)	Accession Number: FERM BP-5629
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).	
<input type="checkbox"/> A Scientific Property <input type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on (date of the original deposit), and received on , a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology  Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL.  Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan  Date: August 15, 1996	



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

取締役社長

永山 治

寄託者

あて名

〒

115

殿

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

## 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC1  
9)

(受託番号)

FERM BP- 5629

## 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

## 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

## 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
そして、  
年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。  
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN.

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日





BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

## TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
Representative: Osamu Nagayama  
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ /pUC19)	Accession Number: FERM BP-5630
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).  <input type="checkbox"/> A Scientific Property <input type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on (date of the original deposit), and received on , a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology  Representative: Michio Ohishi (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL.  Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan  Date: August 15, 1996	



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

### 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

寄託者

取締役社長

永山 治

あて名

〒

115

殿

東京都北区浮間5丁目5番1号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

#### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

*Escherichia coli* JM109 (hMBC1Lq2/pUC19)

(受託番号)

FERM BP- 5630

#### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

#### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。

#### 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
そして、  
年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。  
日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

#### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Ohsishi, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN.

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page.

## TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
Representative: Osamu Nagayama  
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

## I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM

Identification Reference Given by the Depositor:  
mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1

Accession Number:  
FERM BP-5631

## II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION

The microorganism identified under I above was accompanied  
by a document stating the following item(s).

- ☒ A Scientific Property  
☒ Taxonomic Position

## III . RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism  
identified under I above, which was received on August 15, 1996.  
(date of the original deposit)

## IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER

This International Depositary Authority received the microorganism  
under I above on (date of the original deposit), and  
received on , a request for transfer from the original  
deposit to the deposit under the Budapest treaty.

## V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

Representative: Michio Ohishi (sealed)  
Ph. D., DIRECTOR GENERAL.

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan

Date: August 15, 1996



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称)

中外製薬株式会社

寄託者

取締役社長

永山 治

あて名

〒 115

殿

東京都北区浮間5丁目5番1号

### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1

(受託番号)

FERM BP- 5631

### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。

### 移管請求の受領

本国際寄託当局は、  
そして、 年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。  
日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN.

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日

0